DIE ABHÄNGIGKEIT DER NEURONALEN FUNKTION VON DEN REDOXPOTENTIALEN DER ZELLULÄREN NADH–SYSTEME

Diethelm Manfred Kirsch

1979

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535715_0024

Aus dem Institut für Physiologische Chemie und
Physikalische Biochemie
der
Universität München

Vorstand: Prof.Dr.rer.nat.Dr.med.h.c. Th.Bücher
Prof.Dr.rer.nat. M.Klingenberg
Prof.Dr.rer.nat. G.H.Zachau

Die Abhängigkeit der neuronalen Funktion von den Redoxpotentialen der zellulären NADH-Systeme

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Diethelm Manfred Kirsch
aus
Rotthalmünster
1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Brauser
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Th. Bücher
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.79

UNIV. LEIDEN BIBL.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. h.c. Th. Bücher danke ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit in seinem Institut.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. B. Brauser für die Überlassung des Themas und der zur Versuchsdurchführung nötigen Geräte sowie seiner Unterstützung und Kritik.

Frau Feldreier danke ich für die technische Assistenz, Herrn W. Bender, J. Grimm und Kollegen für die feinmechanischen Entwicklungen der Perfusions- und Meßapparaturen, Herrn Dr. H. Schwab für die Entwicklung des Impulsgenerators sowie H. Strobel, H. Erk und H. Hofner für den Ausbau des neurophysiologisch-optischen Meßplatzes.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methoden und Material	4
2.1.	Die Circumfusion des Ganglion cervicale superius	4
2.2.	Elektrophysiologie	7
2.3.	Fluorimetrie	12
2.4.	Metabolitbestimmungen	12
2.5.	Chemikalien	12
3.	Definitionen	13
4.	Ergebnisse und Diskussion	13
4.1.	Das Aktionspotential in Abhängigkeit von der Substratversorgung	13
4.2.	Das Aktionspotential unter veränderter Redoxpotentialdifferenz (ΔE_{M-C})	15
4.3.	Das Aktionspotential als Funktion von ΔE_{M-C} unter erhöhten Substratkonzentrationen	20
4.4.	Veränderung des cytosolischen und mitochondrialen Redoxpotentials unter Beibehaltung ihrer Differenz ΔE_{M-C}	23
5.	Diskussion	25
5.1.	ΔE_{M-C} und die Zellenergetik	25
5.2.	Pathobiochemische Aspekte	28
6.	Zusammenfassung	29
7.	Literaturverzeichnis	31
8.	Lebenslauf	36

1. Einleitung

Die Zellforschung der letzten Jahrzehnte vermittelte differenzierte Erkenntnisse über die Redoxzustände und die Bindungsverhältnisse der Nicotinamidnucleotid-Systeme in den spezifischen subzellulären Kompartimenten. Der Frage nach den Redoxpotentialen der funktionell verschiedenen NAD- und NADP-Systeme und nach deren Wechselbeziehungen in Abhängigkeit von der jeweiligen Stoffwechsellage wurde mit Hilfe der 'Indikatormetabolitsysteme' an intakten Organen durch die Gruppen von Bücher (1-3), Krebs (4,5), Tager (6), Scholz (7) und Sies (8,9,9a) und an isolierten Mitochondrien durch Klingenberg (10), Kaplan (11), Chance (12) und Papa (13) nachgegangen. Direkte spektroskopische und fluorimetrische Messungen der reduzierten Nicotinamidnucleotide an der Leber und an dem Ganglion cerv. sup. der Ratte konnten von Bücher (3) bzw. Brauser (14,15) verschiedenen durch Messung der Indikatormetabolite definierten Redoxzuständen zugeordnet werden.

Dabei zeigte sich, daß durch Bindung des NADH an die Dehydrogenasen das Mittelpotential dieses Pyridinnucleotidsystems im Cytosol um 85 mV (16) in Richtung der Mittelpotentiale der Substratpaare der cytosolischen Dehydrogenasen positiviert wird. Die dadurch bedingte Erhöhung der zellulären Gesamtkonzentration des NADH ermöglichte seine optische Messung.

Während der synaptischen Transmission des Ganglion cerv. sup. wurde nach repetitiver Reizung (5 s, 6 Hz) (17) und nach Einzelreiz (18) eine initiale Oxidation des NAD(P)H gefolgt von komplexen reversiblen Änderungen der Redoxpotentiale der mitochondrialen und cytosolischen NAD(P)-Systeme fluorimetrisch beobachtet. Diese Oxidation wurde als Aktivierung der Atmungskette (Status 4 ⟶ 3) durch das während der Erregung gebildete ADP ("ADP-Stoß") interpretiert. In der Tat steigt während der Stimulation der Sauerstoffverbrauch um 50 % (28).

Eine reversible, später irreversible Verminderung des Aktionspotentials tritt, wie Dolivo (19,20) für verschiedene Substrate zeigte, während der Stimulation bei eingeschränkter Substratversorgung ein (21).

In der vorliegenden Arbeit wird die Frage untersucht, welche Bedeutung die Redoxpotentiale der cytosolischen und der mitochondrialen NAD(P)-Systeme für die synaptische Transmission haben; d.h. die Frage: hängt die Funktion von der Konzentration eines oder mehrerer Substrate des Cytosols und/oder der Mitochondrien ab ('Substratfunktion'), oder spielt das Verhältnis der Substrate zueinander ('Redoxfunktion') die entscheidende Rolle? Diese Differenzierung ist insofern von Belang, als dem Pyruvat und - in der frühen Entwicklung und im Hunger - den Ketonkörpern Hydroxybutyrat und Acetoacetat eine überragende Bedeutung als Substrate ('Wasserstoffdonatoren') zukommt (22,23),

zumal Fettsäuren im Nervengewebe keine Substrate sind (24,25).

Die Metabolitpaare, die zur Einstellung ('Redoxpufferung') eines bestimmten Redoxpotentials des Cytosols (Laktat/Pyravat) oder der Mitochondrien (Hydroxybutyrat/Acetoacetat) benutzt wurden (2), werden hier gleichzeitig in definierter Relation dem Ganglion mit der Perfusionsflüssigkeit zugeführt, um in jedem der beiden Kompartimente der Zelle ein bestimmtes Redoxpotential festzulegen. Damit ist das Redoxpotential in beiden Kompartimenten stabilisiert und wird nicht mehr durch stoffwechselbedingte Änderungen der Konzentration der endogenen Substrate der Dehydrogenasen beeinflußt. Dieses Verfahren entspricht auch der physiologischen Situation, weil das Nervengewebe in vivo der 'Redoxpufferung' durch die genannten Metabolitpaare, die in dem perfundierenden Blut immer enthalten sind (cf 26, 27, 27a), unterliegt.

Sowohl in ihrer Konzentration als auch in ihrem Redoxverhältnis verändern sich diese Metabolitpaare besonders unter pathologischen Bedingungen z.B. bei Laktatazidose und dem diabetischen Coma. Es ist zu fragen, welche Rolle das Redoxverhältnis für die klinische Symptomatik neben den diskutierten Größen wie Substratkonzentration, pH und Elektrolythomoiostase spielt.

Deshalb haben wir hier die Abhängigkeit der synaptischen Transmission von der Differenz der cytosolisch-mitochond-

rialen Redoxpotentiale ΔE_{M-C} gemessen.

Die synaptische Transmission wird als Indikator der Energieversorgung benutzt, da sie eine rasche (28) und reversible Steigerung der Leistung des glycolytischen und mitochondrialen Energiestoffwechsels um 50 % darstellt. Die praesynaptische Region mit dem relativ höchsten Energieverbrauch - infolge des besonders großen Oberflächen/Volumen Verhältnisses (29) - ist besonders empfindlich gegen energetische Störungen, wie Dolivo in Substratmangelversuchen gezeigt hat (30,31,32). Die Kinetik der Einstellung der verschiedenen Redoxpotentiale durch die genannten Redoxpuffer wird durch kontinuierliche Registrierung der NAD(P)H Oberflächenfluoreszenz - bis zur Einstellung des jeweiligen Fließgleichgewichtes - verfolgt.

2. Methoden und Material

2.1. Die Circumfusion des Ganglion cervicale superius

Das GCS wurde wie beschrieben (28) weiblichen Wistar-Ratten (Stamm FW 49, Kirchberg, Lemgo, Bib) von 100-150 g in Urethan Narkose (0,1 g/100 g Körpergewicht) entnommen. Die Bindegewebshüllen wurden entfernt und das Ganglion in der Circumfusionskammer fixiert. Die Kammer wurde von Prof. Dolivo, Physiologisches Institut der Universität Lausanne, konstruiert.

Der Aufbau zur Durchströmung ist in Abb.1 beschrieben.

Das Krebs-Henseleit-Bicarbonat Medium war mit 95% O_2/5% CO_2

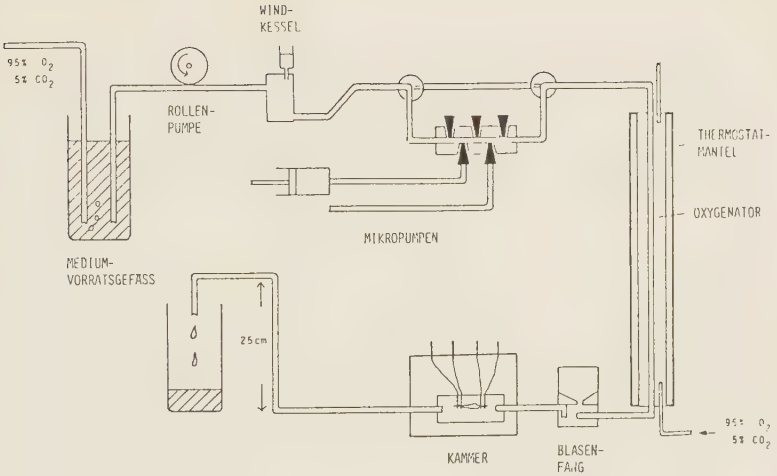

Abb. 1

Der Aufbau der Circumfusion des GCS.

Die Substrate werden über die in der Bildmitte angedeuteten Präzisionsmikropumpen durch Kanülen von 0,1 mm Innendurchmesser in den Flüssigkeitsstrom des Mehrfach-T-Stückes injiziert. Die Pumpengeschwindigkeit kann zwischen 1 und 1000 µl/min kalibriert verstellt werden. (Durchflußvolumen 0,3 ml/min). Einrichtung zur Thermostatisierung auf 37°C nicht eingezeichnet.

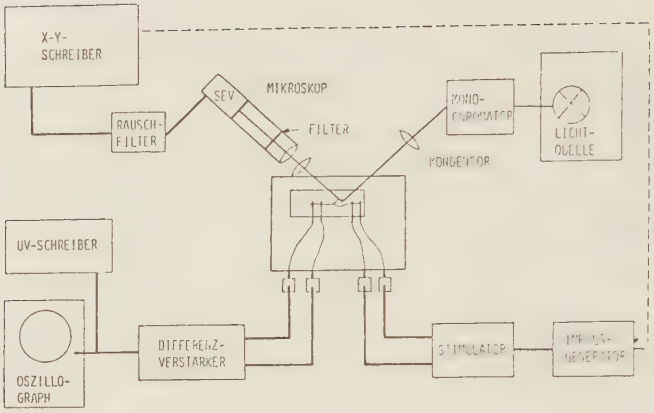

Abb. 2

Apparatur zur gleichzeitigen Registrierung der Aktionspotentiale und der Pyridinnukleotid Fluoreszenz.

Der 45° Illuminator (Leitz, Wetzlar) zur Lichtführung ist nur schematisch durch Linsen angedeutet; er gestattet die genaue Justierung und Fokussierung des Exzitationslichtes auf dem GCS (der Lichtfleck hat einen Durchmesser von 30 µm).

auf pH 7,4 (28) eingestellt und enthielt 5 mM Glucose. Der Druck in der Kammer wurde hydrostatisch auf 25 mbar eingestellt. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 0,3 ml/min.

2.2. Elektrophysiologie

Der Truncus cervicalis wurde durch extrazelluläre Reizelektroden mit einem GRASS SD 9-Stimulator gereizt, der durch einen programmierbaren Impulsgenerator gesteuert wurde (Abb.2). Das Aktionspotential wurde durch extrazelluläre Platinelektroden vom Nervus carotideus internus abgeleitet, durch einen GRASS P 15 Preamplifier verstärkt und auf einem Tektronix Speicheroszillographen beziehungsweise einem Finnigan UV-Schreiber (1015-5 B) aufgezeichnet. Am Anfang des Versuches wurde Rheobase und Chronaxie bestimmt. Die Reizzeit der Chronaxie blieb über den Versuch konstant. Die Reizspannung wurde so gewählt, daß ein maximales Aktionspotential ausgelöst werden konnte, und um 0,5 Volt höher zur supramaximalen Reizung eingestellt. Höhere Reizspannungen führten zu keinem weiteren Anstieg des Aktionspotentials. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß ganglionäre Zellen durch eine zu hohe Reizspannung direkt erregt werden.
Die Reizspannung lag bei den Versuchen zwischen 4 und 6 Volt, die Reizzeit bei 0,45 msec.

AKTIONSPOTENTIAL

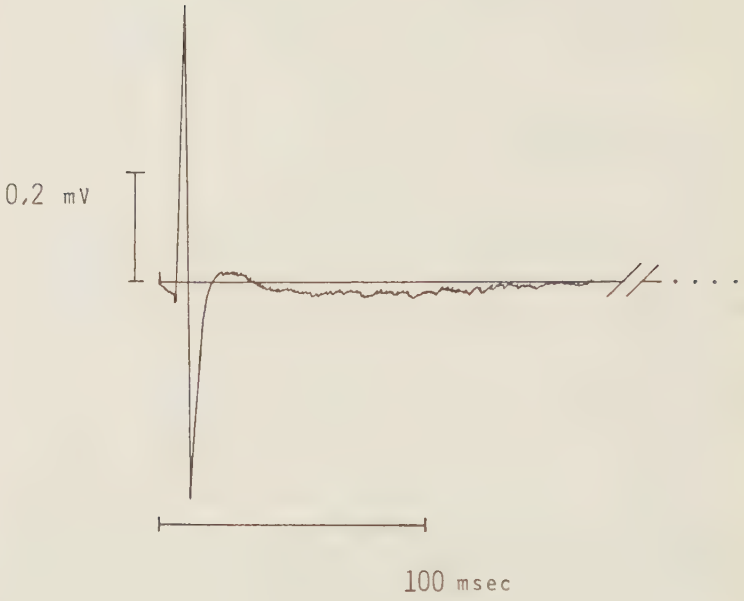

Abb. 3

Das Aktionspotential nach Einzelreiz des isoliert mit glucosehaltigem Krebs-Henseleit Medium umströmten GCS. (Negative Ablenkung nach oben) Kopie einer Aufzeichnung des UV-Schreibers; Reizartefakt retouchiert.

Abb.3 zeigt ein einzelnes Aktionspotential.
In unseren Versuchen wurde das maximale Aktionspotential in Reizfolgen von 6 Stimuli pro Sekunde über 30 Sekunden bestimmt, da ein isolierter Einzelreiz nur einen Teil der Neurone aktiviert (34). Die Veränderungen des maximalen Aktionspotentials einer Reizfolge wurden jeweils auf den Wert bezogen, der unter physiologischen Substratkonzentrationen erzielt wurde und in % Werten ausgedrückt.

Das postsynaptische Aktionspotential diente in diesen Versuchen als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des Gewebes.
Die synaptische Transmission hängt vom ungestörten Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren ab, wie der Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials, den physiologischen Elektrolytkonzentrationen, der Fortleitung des Aktionspotentials, der Synthese, der Ausschüttung und der Reaktion des Transmitters Acetylcholin mit den Rezeptoren der ganglionären Zelle sowie anderer synaptischer Regulations mechanismen.
Die Ausbildung des Aktionspotentials selbst ist die unmittelbare Folge spezifischer, zeitlich geordneter Veränderungen der Na-K Permeabilität und nicht direkt der Stoffwechselenergie abhängig. So kann ein isoliertes Axon auch ohne Substrat oder bei Vergiftung der Atmungskette in Elektrolytlösung über Stunden ein Aktionspotential

ausbilden. Doch konnte von Dolivo (30) gezeigt werden, daß die Überleitung eines präsynaptisch ausgelösten Reizes bei Glucosemangel durch die Zerstörung der präsynaptischen Nervenendigungen verhindert wird.

Wir versuchten daher, in unseren Experimenten von einer Situation des Substratmangels auszugehen, um einen ungünstigen Zustand der Redoxbedingungen in seiner Auswirkung auf das Aktionspotential erkennen zu können.
Zu Beginn unserer Versuche wurde daher eine Anoxie bis zur vollen Reduktion des NADH durchgeführt und dann Sauerstoff bei Substratmangel eingeleitet. Dabei wird das NADH völlig oxidiert. Eine unzureichende Zufuhr von Substraten in dieser Situation führt dann zum Verlust des Aktionspotentials innerhalb von 5 Minuten.

Wir gingen daher von der Vorstellung aus, daß eine mangelnde Substratversorgung oder eine anderweitige Störung des Energiestoffwechsels zum Verlust des Aktionspotentials führt und somit das postsynaptische Aktionspotential ein Maß für die funktionelle Integrität des Gewebes ist. Es stellt eine einfach zu messende Größe für eine ausreichende Energieversorgung dar und läßt Studien zur Auswirkung des Redoxstoffwechsels auf die Energieversorgung im intakten System ohne Zerstörung des Gewebes und den damit möglichen Artefakten zu.

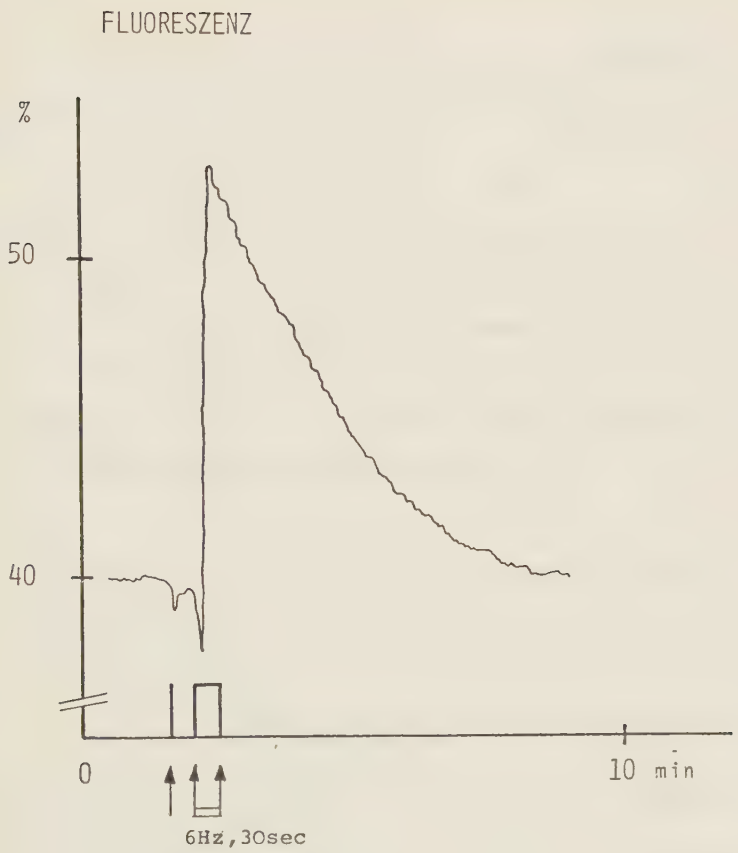

Abb. 4

Die Pyridinnukleotid Fluoreszenz (360 nm → 420 nm) nach Stimulation.

Schwache Oxidation (nach unten) nach Einzelreiz (links). Die Oxidation mit nachfolgender Reduktion (nach oben) der Pyridinnukleotide nach einer Reizfolge von 6 Hz, 30 sec beträgt 15% der Fluoreszenz. (Eichung: Anoxischer, substratgesättigter Zustand - normoxischer, substratfreier Zustand des Ganglion).

2.3. Fluorimetrie

Die Fluoreszenz der Pyridinnukleotide wurde, wie von Brauser (17) bereits beschrieben, mit einem Leitz 45° Illuminator in dem GCS mit 340 nm angeregt und nach Passieren eines 420 nm Steilkantenfilters (KG 420 Schott u. Gen., Mainz) von einem EMI 9601/B Photomultiplier aufgenommen und mit einem Servogor Schreiber (Metrawatt) registriert. Monochromatisches Licht wurde mit einem Gittermonochromator (Farrand UV/Vis) mit 5 nm Bandbreite aus einer 150 W, 24 V Halogen Lampe (Osram-Bellaphot) gewonnen.

2.4. Metabolitbestimmungen

Die Konzentration von L-Laktat, Pyruvat, D-3-Hydroxybutyrat, Acetoacetat und Glucose im Medium wurde im enzymatischen optischen Test bestimmt (siehe 36).

2.5. Chemikalien

Na-L-Laktat stammte von Roth, Karlsruhe; Na-Pyruvat und DL-3-Hydroxybutyrat von E. Merck AG., Darmstadt; Na-Acetoacetat wurde aus Li-Acetoacetat (Sigma, München) durch Austausch mit Dowex 50 WX 8 Kationenaustauscher kurz vor Versuchsbeginn hergestellt. Diese Substanzen wurden im Medium gelöst und mit HCl bzw. NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die für die enzymatischen Tests benötigten Enzyme und Coenzyme sind von Boehringer, Mannheim.

3. Definitionen

Das Redoxpotential des Cytosols ist (pH 7; 37°C) wie folgt definiert:

$$E'_C = -211 - 30{,}7 \cdot \log \frac{L}{P} \text{ (mV)} \qquad (1)$$

(P = [Pyruvat]; L = [Laktat]).

Das mitochondriale Redoxpotential ist definiert:

$$E'_M = -296 - 30{,}7 \cdot \log \frac{B}{A} \text{ (mV)} \qquad (2)$$

(A = [Acetoacetat]; B = [D-ß-Hydroxybutyrat]).

Die Werte 211 mV bzw. 296 mV sind die Mittelpotentiale des L/P bzw. des B/A Redoxsystems (4,37).

Die Redoxpotentialdifferenz ΔE_{M-C} ist damit:

$$\Delta E_{M-C} = E'_M - E'_C \qquad (3)$$

$$\Delta E_{M-C} = -85 + 30{,}7 \cdot \log \frac{A \cdot L}{B \cdot P} \text{ (mV)}. \qquad (4)$$

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Das Aktionspotential in Abhängigkeit von der Substratversorgung

Über die Substratabhängigkeit der Funktion neuraler Gewebe, z.B. von Glucose, Sauerstoff, Aminosäuren etc., ist bereits berichtet worden (35,18,24). Diese Abhängigkeit wurde hier für die als 'Redoxpuffer' verwendeten Substrate Pyruvat, Laktat, Acetoacetat und Hydroxybutyrat untersucht. Das AP in Abhängigkeit von der Glucose bzw. der Na-Pyruvat-Konzentration ist in den Kurven a der Abb. 5 dargestellt. Sowohl Glucose als auch Pyruvat können die

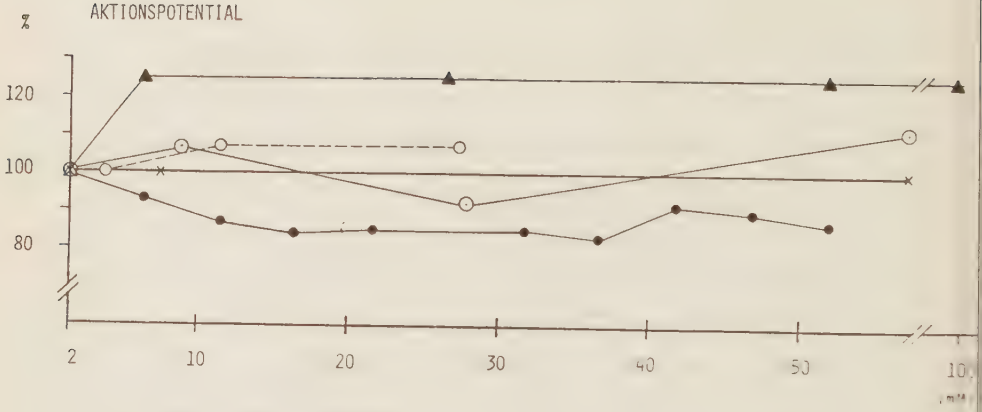

Abb. 5
Das Aktionspotential in Abhängigkeit von:
a) der Konzentration der verschiedenen Substrate (o = [Glucose]; ● = [Na-Pyruvat]; für Laktat, D-β-Hydroxybutyrat und Acetoacetat wurde die gleiche Abhängigkeit gefunden (nicht eingezeichnet).
b) der Gesamtkonzentration der cytosolischen (x = [Laktat] + [Pyruvat]; L/P = 7) oder mitochondrialen Redoxpuffer bei konstantem Redoxpotential: o = [Hydroxybutyrat] + [Acetoacetat]; bei [OHB]/[AcAc] = 1.
c) der Gesamtkonzentration der cytosolischen und mitochondrialen Redoxpuffer ▲ = [Lac] + [Pyr] + [OHB] + [AcAc] mit einer konstanten Redoxpotentialdifferenz zwischen Mitochondrien und Cytosol von ΔE_{max} = -60 mV. Der cytosolisch/mitochondriale Quotient der jeweiligen Konzentrationsquotienten Laktat/Pyruvat und Hydroxybutyrat/Acetoacetat (C/M) = 7.

Funktion des Ganglion über mehr als 24 Stunden aufrecht erhalten. Auch Laktat oder Hydroxybutyrat bzw. Acetoacetat ersetzen Glucose. Diese Daten wurden nicht in Abb. 5 eingezeichnet. Die Erhöhung der Konzentration des cytosolischen Redoxpuffersystems Laktat/Pyruvat bei gleichbleibendem Laktat/Pyruvat-Quotienten von 7 (b der Abb. 5) verursacht ebenfalls keine Verminderung des Aktionspotentials. Das gleiche wurde für die mitochondrialen Substrate Hydroxybutyrat und Acetoacetat, die mit einem konstanten Konzentrationsquotienten von 1 in variabler Summenkonzentration verabreicht wurden, beobachtet.
Diese Substrate beeinflussen also die Funktion bis zu einer Konzentration von etwa 0,1 M nicht, sofern sie einzeln gegeben werden oder bei konstantem Redoxquotienten in ihrer Gesamtkonzentration verändert werden. Auch die Konzentrationserhöhung der sowohl cytosolischen als auch der mitochondrialen Substrate unter Wahrung der physiologischen Redoxquotienten verursacht keine Verminderung des Aktionspotentials (c in Abb. 5).

4.2. Das Aktionspotential unter veränderter Redoxpotentialdifferenz (ΔE_{M-C})

Die in Abb. 5 zusammengestellten Beobachtungen wurden unter experimentellen Bedingungen gemacht, die im Hinblick auf die Redoxverhältnisse eines gemeinsam haben: Die Redoxpotentialdifferenz ΔE_{M-C} (s. Definitionen) zwischen Mitochondrien und Cytosol wurde konstant gehalten (c in

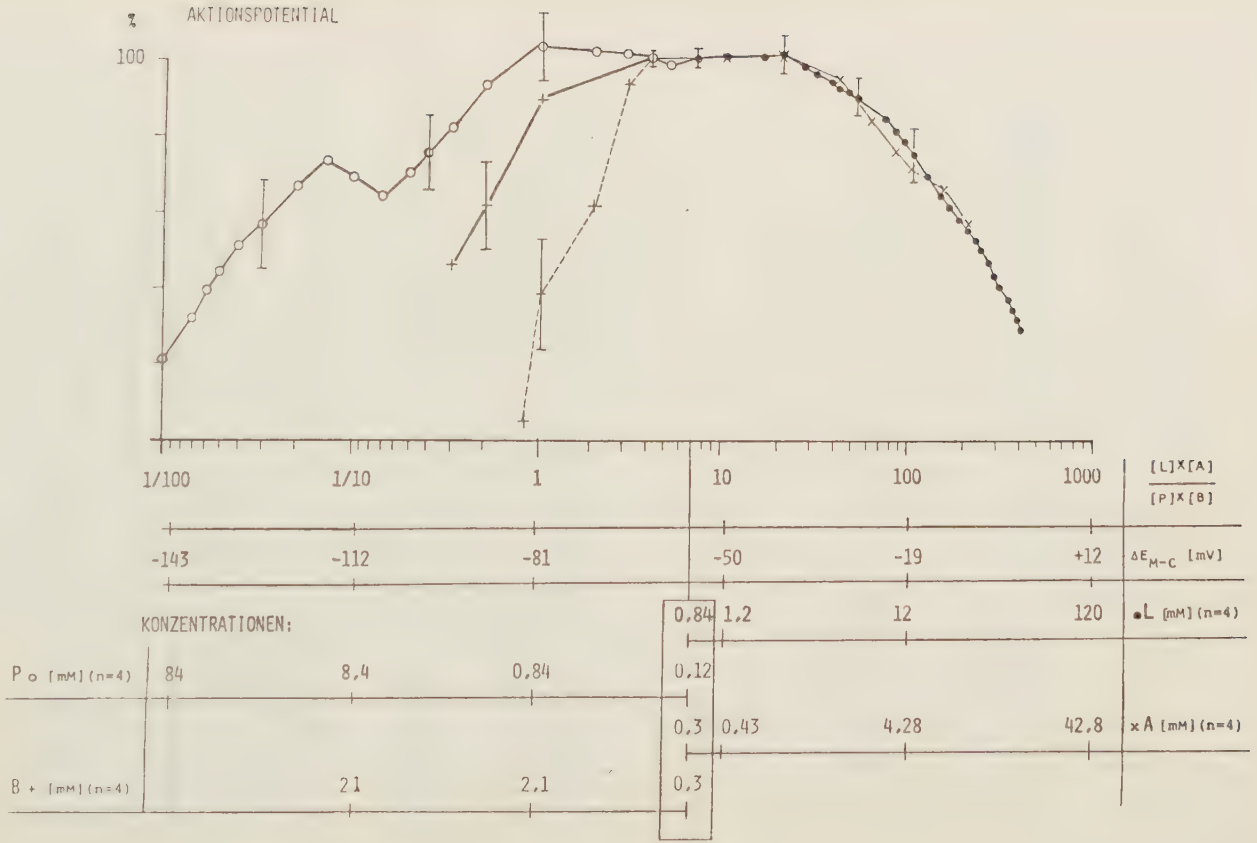
%
AKTIONSPOTENTIAL
100
1/100
1/10
1
10
100
1000
[L]x[A] / [P]x[B]
-143
-112
-81
-50
-19
+12
ΔE M-C [mV]
KONZENTRATIONEN:
0,84
1,2
12
120
•L [mM] (n=4)
P o [mM] (n=4)
84
8,4
0,84
0,12
0,3
0,43
4,28
42,8
x A [mM] (n=4)
B + [mM] (n=4)
21
2,1
0,3

Abb. 6

Abb. 6

Die Amplitude des Aktionspotentials in Abhängigkeit von der Redoxpotentialdifferenz ΔE_{M-C}.

Die Abszisse ist logarithmisch unterteilt. In der ersten Zeile der Beschriftung ist der Quotient der Konzentrationsquotienten Laktat/Pyruvat und Hydroxybutyrat/Acetoacetat aufgetragen (LxA/PxB). Dementsprechend ist die zweite Zeile die lineare Skala der Redoxpotentialdifferenz ΔE_{M-C} (siehe Defintionen). In den vier darunterliegenden Zeilen sind die Konzentrationen der jeweiligen Substrate eingetragen. Während der Titration wurde von den Substraten Laktat 0,85 mM, Pyruvat 0,12 mM, Acetoacetat 0,30 mM und Hydroxybutyrat 0,30 mM nur jeweils eines in seiner Konzentration geändert, während die restlichen drei konstant blieben, so daß jeweils das Redoxpotential eines Kompartimentes und die Redoxpotentialdifferenz verändert wurde.

Die Kurven wurden durch Konzentrationsänderung folgender Substrate gemessen:

o = Pyruvat, ● = Laktat, + = Hydroxybutyrat, x = Acetoacetat.

Die Meßpunkte für Hydroxybutyrat (+, dick ausgezogen) wurden mit erhöhter supramaximaler Reizstärke erhalten, während die gestrichelte + Kurve mit konstanter, zu Versuchsbeginn bestimmter supramaximaler Reizspannung gemessen ist.

Die Streubreite ist als $\pm\sigma$ über den Mittelwerten (n = 4) eingetragen.

Abb. 5), oder es wurde nur ein Metabolit (a Abb.5) bzw. ein Redoxpaar in der Konzentration geändert (b Abb. 5).

Mit zunehmender Änderung dieser Potentialdifferenz ΔE_{M-C} vermindert sich das Aktionspotential und geht gegen Null. Dieser Verlust des Aktionspotentials wird in Abb. 6 und 7 veranschaulicht. Er geschieht unter Substratkonzentrationen, die wesentlich niedriger liegen als in den Experimenten zu Abb. 5.

Die Differenz ΔE_{M-C} ist dem logarithmierten Konzentrationsquotienten, d.i. das Verhältnis des mitochondrialen Konzentrationsquotienten (B/A) zu dem cytosolischen Konzentrationsquotienten (L/P), proportional (Gl.4).

Die Redoxtitrationen, die eine Variation dieses Quotienten unter gleichzeitiger Messung des Aktionspotentials zum Ziel hatten, wurden so durchgeführt, daß jeweils nur eines der vier Substrate in seiner Konzentration variiert wurde, während die anderen drei konstant blieben. So wurde der linke Ast der oberen Kurve der Abb. 6 (offene Kreise) unter Konstanthaltung des physiologischen Redoxpotentials des mitochondrialen B/A-Systems von -296 mV das cytosolische Redoxpotential durch Erhöhung der Pyruvatkonzentration auf maximal 73 mM bei gleichbleibender Laktatkonzentration von 0,85 mM erhalten. Dies entspricht einem L/P von 0,012 und einer Potentialdifferenz (ΔE_{M-C}) von -143 mV. Der rechte Teil dieser Kurve wurde durch Erhöhung der Laktatkonzentration bei gleichbleibender Konzen-

tration der restlichen drei Metabolite erhalten. Analog wurden die angekreuzten Kurventeile (linke Hälfte der Abb. 6) gemessen: Unter Beibehaltung des physiologischen cytosolischen Redoxpotentials von -236 mV (entsprechend L/P = 8) wurde die Hydroxybutyratkonzentration auf maximal 10 mM erhöht. Es wurde also das tatsächliche mitochondriale Redoxpotential von dem physiologischen Wert von -296 mV auf etwa -350 mV erniedrigt, entsprechend ΔE_{M-C} = -114 mV.
Als charakteristisch werden die Potentialdifferenzen (ΔE_{M-C}) angegeben , deren Über- bzw. Unterschreitung das Aktionspotential unter 50% absinken läßt. Diese 'Grenzwerte' von ΔE_{M-C} betragen für die 'HOB-AcAc' Titration der Abb. 6 -13 mV als oberer und -97 mV als unterer Grenzwert.
Eigenartigerweise mußte die supramaximale Reizspannung in den Titrationen in Richtung des unteren Grenzwertes erhöht werden (li. Hälfte der Abb. 6). In Titrationen in Richtung des oberen Grenzwertes (re. Hälfte der Abb. 6) blieb die supramaximale Reizstärke gleich. Der aus der unteren Kurve ermittelte untere Grenzwert von -79 mV dürfte am ehesten mit dem physiologischen Verhalten vergleichbar sein. So ist beispielsweise die tolerierbare Schwankungsbreite,innerhalb derer die neuronale Funktion noch zu 50% erhalten bleibt, bei Hydroxybutyrat nur etwa ±33 mV. Diese Toleranz wird bereits durch Erhöhung des [Laktat/Pyruvat] oder des [Hydroxybutyrat/Acetoacetat] Quotienten um den Faktor 10 überschritten.

Die Vergrößerung der Toleranzbreite nach Pyruvaterhöhung auf >1 mM sowie die Verbesserung der Funktion bei 7 mM Pyruvat weisen auf die zentrale Stellung des Pyruvates im Intermediärstoffwechsel und möglicherweise auf die Interkonversion der Pyruvatdehydrogenase hin (38).
Die Titration in Richtung einer positiveren ΔE_{M-C} (re. Hälfte Abb. 6) wurde sowohl durch Laktat- als auch Acetoacetat-Konzentrationserhöhung erreicht. Trotz dieser gegensinnigen Veränderung der Ist-Redoxpotentiale im mitochondrialen und cytosolischen Kompartiment ergibt die Auftragung des Aktionspotentials gegen die Differenz der Redoxpotentiale (ΔE_{M-C}) einen identischen Kurvenverlauf. Wider Erwarten ergibt sich daraus die überraschende Konsequenz, daß die Absolutwerte der cytosolischen und die der mitochondrialen Redoxpotentiale offensichtlich als solche für die hier betrachtete Funktion keine Rolle spielen. Entscheidend ist vielmehr die aus ihnen resultierende Redoxpotentialdifferenz zwischen mitochondrialem und cytosolischem Kompartiment ΔE_{M-C}.

4.3. Das Aktionspotential als Funktion von ΔE_{M-C} unter erhöhten Substratkonzentrationen

Die Verwendung von Indikatormetaboliten in Perfusionsflüssigkeiten zur Redoxpufferung setzt voraus, daß die extrazellulär vorgegebenen Konzentrationsquotienten tatsächlich intrazellulär realisiert sind. Eine Abweichung

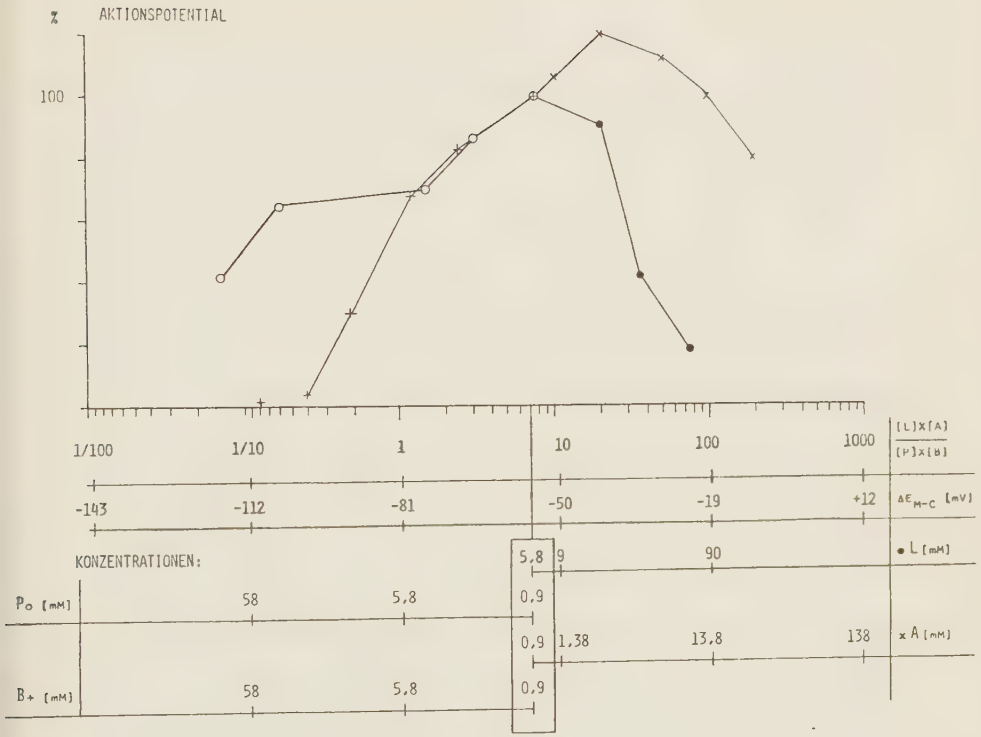

Abb. 7
Abhängigkeit des Aktionspotentials von der mitochondrial-cytosolischen Redoxpotentialdifferenz bei fünffach erhöhter Konzentration der vier Redoxpuffersubstrate der Abb.6. Symbole und Koordinaten wie in Abb. 6.

hängt von dem Fließgleichgewicht, dem diese Substrate unterliegen, ab. Durch Erhöhung der Substratkonzentration sollte diese Abweichung geringer werden. Daher wurde die Summenkonzentration der vier Redoxmetabolite um den Faktor 5 erhöht. Unter derart erhöhter Substratkonzentration ist (Abb.7) die Funktion - ebenso wie in Abb. 6 gezeigt - von ΔE_{M-C} abhängig. Die Redoxpotentialdifferenz für optimale Funktion entsprach der unter physiologischen Metabolitkonzentrationen gemessenen ΔE_{M-C} von -60 mV bei Variation des cytosolischen Redoxpotentials. Die Bandbreite der Toleranzgrenzen bis zu 50% Verlust des Aktionspotentials war wesentlich kleiner (±30 mV) als in den Experimenten mit physiologischen Ausgangskonzentrationen (±50 mV). Die Empfindlichkeit gegen Änderungen von ΔE_{M-C} sind daher unter höheren Substratkonzentrationen gesteigert.
Die Fließgleichgewicht-bedingten Einflüsse auf die Redoxpufferung haben daher keine entscheidende Bedeutung. Die Titration,in der das mitochondriale Redoxpotential durch Acetoacetat positiviert wurde, zeigte eine Verschiebung der optimalen Redoxpotentialdifferenz um +15 mV auf etwa -45 mV.
Die weitgehende Übereinstimmung der Versuche der Abb. 6 mit denen der Abb. 7 im Hinblick auf die Bedeutung von ΔE_{M-C} für die neuronale Funktion sind um so erstaunlicher, als die Ionenkonzentration der Ausgangskonzentrationen um den Faktor 5 gesteigert wurde. Das optimale Aktionspotential sank beim Übergang zu der fünffachen Substratkonzen-

tration nicht ab.

Der vergleichsweise geringe Einfluß der Ionenkonzentration wurde auch in Versuchen festgestellt, in denen die NaCl-Konzentration entsprechend der gesteigerten Na-Substratkonzentration vermindert wurde (Abb.8). Es zeigte sich, daß eine Erhöhung der Substratkonzentration die gleiche geringe Aktionspotentialänderung bedingte, ob die Ionenkonzentration konstant gehalten wurde oder nicht.

4.4. Veränderung des cytosolischen und mitochondrialen Redoxpotentials unter Beibehaltung ihrer Differenz ΔE_{M-C}

Das Ist-Potential des cytosolischen (E'_C) und/oder des mitochondrialen (E'_M) NADH-Systems, ausgehend von normalen Redoxbedingungen (Kasten in Abb. 6 Mitte unten) wurde durch Konzentrationserhöhung von Hydroxybutyrat und Laktat erniedrigt. Das Aktionspotential unter diesen Bedingungen ist in Abb. 8 (o) dargestellt. Die gleiche Potentialänderung in beiden Kompartimenten wurde durch Erniedrigung der Pyruvatkonzentration und gleichzeitiger Erhöhung der Hydroxybutyratkonzentration erreicht, das Ergebnis ist, daß keine nennenswerte Änderung des Aktionspotentials (▲, Abb. 8) eintritt.

Die Negativierung des Redoxpotentials in beiden Kompartimenten (Abb. 8a) betrug bis zu 60 mV. Eine derartige Potentialänderung in nur einem Kompartiment und damit einer Änderung von ΔE_{M-C} (Abb. 6 + 7) führt zum Verlust des Aktionspotentials.

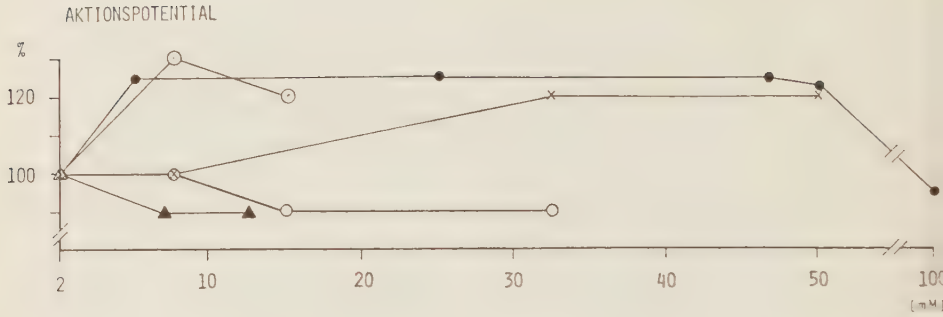

Abb. 8

Das Aktionspotential in Abhängigkeit von der Gesamtkonzentration der Redoxpartner bei konstanter Redoxpotentialdifferenz $\Delta E_{M-C} = -60$ mV.

a) o = Verminderung des cytosolischen und mitochondrialen NAD/H Redoxpotentials durch gleichzeitige Erhöhung von Laktat und Hydroxybutyrat bei konstanter Pyruvat und Acetoacetat Konzentration.

▲ = wie oben, jedoch durch Erhöhung von Hydroxybutyrat und Verminderung von Pyruvat, bei konstanter Laktat und Acetoacetat Konzentration.

b) x = Erhöhung von Laktat und Pyruvat bei konstanter Hydroxybutyrat und Acetoacetat Konzentration.

c) ● = Erhöhung aller Redoxpartner bei konstantem E_C und E_M und gleicher Redoxpotentialdifferenz $\Delta E_{M-C} = -60$ mV. (LxA/PxB = 7)

o = wie oben, jedoch mit Ausgleich der [Na^+-Substrat$^\ominus$]-Konzentration durch Verminderung der NaCl Konzentration.

Auch die Konzentrationserhöhung aller Redoxkomponenten ohne Änderung der Aktionspotentiale E'_M und E'_C bei konstantem ΔE_{M-C} führt zu keiner wesentlichen Änderung des Aktionspotentials bis zu einer Summenkonzentration von 100 mM (● b+c, Abb. 8).

5. Diskussion

5.1. ΔE_{M-C} und die Zellenergetik

Wir haben gezeigt, daß weder Substrat - noch osmotische - Effekte für die Erniedrigung des Aktionspotentials verantwortlich sind. Es ist weiterhin unwahrscheinlich, daß die beobachtetet Abhängigkeit andere (spezifische Inhibitoreffekte) Gründe hat als eben die veränderte Redoxsituation. Für das Erlöschen der neuronalen Funktion dürfte daher eine verminderte Energieversorgung der Na-K-ATPase und anderer energieabhängiger neuronaler Prozesse verantwortlich sein, wobei, wie oben erläutert, die praesynaptischen Nervenendigungen mit dem relativ größten Energieverbrauch am stärksten betroffen sind. Das Aktionspotential vermindert sich, da die Anzahl der erregten postganglionären Zellen geringer wird.

Es war schon früh in der Betrachtung der Wasserstoff-Flüsse der Zelle klar geworden, daß die stöchiometrisch bei der Glykolyse freigesetzten 2 Wasserstoff-Äquivalente pro einem in den Mitochondrien verbranntem Pyruvat durch spezielle Transportmechanismen über die innere Mitochondrienmembran transportiert werden müssen, da diese für NAD(P)H impermeabel ist. Neben der von Bücher vorgeschlagenen, in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten GDH spielt

dafür der von Borst vorgeschlagene Malat-Aspartat Shuttle die wichtigste Rolle (39,40).

Dieser experimentell nachgewiesene Mechanismus hatte jedoch eine "thermodynamische Lücke", nämlich die Differenz der Potentiale von NADH im Cytosol und Mitochondrien, die in der Leber (2) circa 60 mV beträgt. Der Wasserstofftransport von Cytosol in die Mitochondrien erfordert also 12 kJ/Mol. Bücher und Sies (2) schlugen zur Überwindung dieser Spanne die Energiedifferenz zwischen dem mitochondrialen NADPH und NADH System ("energieabhängige Transhydrogenase") vor. In unseren Experimenten wurde die entscheidende Bedeutung der Redoxpotentialdifferenz ΔE_{M-C} der NADH Systeme für die Funktion gezeigt, wobei das NADPH System nicht beeinflußt wurde.

La Noue et al (41) fanden, daß der Wasserstofftransport in dem von Borst vorgeschlagenen Shuttle von einem energieabhängigen Transport von Aspartat aus den Mitochondrien in das Cytosol abhängt. Der Aspartat-Transport hängt dabei von ψ, der elektrischen Komponente des von Mitchell (42) postulierten "Protonischen Potentials" der inneren Mitochondrienmembran ab. Eine Verminderung von ΔE_{M-C} durch Laktat- und Acetoacetat-Erhöhung würde den Wasserstoff-Fluß vom Cytosol in die Mitochondrien erhöhen, wobei mehr Aspartat ins Cytosol transportiert und Energie verbraucht wird.

Das Aktionspotential nimmt letztlich ab, da andere von

ψ oder cytosolischem ATP-abhängige Reaktionen ungenügend versorgt werden, wie die ATP/ADP Translokation (Klingenberg 43). Vergrößert sich ΔE_{M-C} bei Pyruvat und D-ß-Hydroxybutyrat Erhöhung, dann muß zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zunehmend mehr Wasserstoff aus den Mitochondrien in das Cytosol transportiert werden, was nach Davis und Lumeng (44) nur unter extremen Bedingungen erreicht werden kann. Wenn dies durch Aspartat Transfer vom Cytosol in die Mitochondrien geschieht, sollte ψ erhöht und damit die Atmungskette gehemmt werden. Einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierungspotential und Redoxpotentialdifferenz der NADH Systeme haben auch Davis und Lumeng (44) gefunden. Sie untersuchten an isolierten Mitochondrien den Wasserstofftransport bei definierten Redoxpotentialen und verschiedenen Aktivitätszuständen der Atmungskette. Dabei zeigte sich, daß bei einem extra - zu intramitochondrialen Quotienten von $NAD^+_o \times NADH_i / NADH_o \times NAD^+_i = 25$ entsprechend einem ΔE_{M-C} von -43 mV kein Netto-Wasserstofftransport mehr stattfindet. Erst bei Entkopplung der Atmungskette glichen sich die cytosolischen und mitochondrialen NADH-Potentiale an.
Die damit bestätigte Abhängigkeit der Redoxpotentialdifferenz von der Energieversorgung durch die Mitochondrien und die enge Verknüpfung von Wasserstofftransport mit der Regulation der Energiebereitstellung durch ψ an der inneren Mitochondrienmembran (45) bieten eine theoretische Erklärung der hier gefundenen Abhängigkeit der neuronalen

Funktion von der Redoxpotentialdifferenz zwischen Cytosol und Mitochondrien.

5.2. Pathobiochemische Aspekte

Die klinische Relevanz dieser Beobachtungen liegt nahe, da in verschiedenen pathologischen Stoffwechselzuständen wie bei Laktatazidose oder dem Diabetischen Koma Veränderungen des L·A/P·B Quotienten beobachtet werden (26).

Aus Untersuchungen am Menschen stammende Daten zeigen, daß die Redoxpotentialdifferenz in den hier beobachteten physiologischen Grenzen liegen (Dietze, persönliche Mitteilung). Nur bei Alkoholgabe nach 60stündigem Fasten beobachtet man ein ΔE_{M-C} von -30 mV, was nach den oben beschriebenen Ergebnissen dem Grenzwert einer normalen Funktion entspricht. Es ist zu vermuten, daß ähnliche Grenzsituationen im Coma diabeticum, welches durch intrazellulären Glucosemangel und Ketoacidose charakterisiert ist, erreicht werden. Der hier gefundene Zusammenhang zwischen der Differenz der Redoxpotentiale und der neuronalen Funktion weist auf einen allgemeinen Zusammenhang zwischen Wasserstoff- und Energiestoffwechsel hin, was ein wichtiger Faktor für die Pathophysiologie dieser Krankheitsbilder sein könnte.

Die Abhängigkeit der neuronalen Funktion von den Redoxpotentialen der zellulären NADH-Systeme.

6. Zusammenfassung

1) Das Aktionspotential des isolierten Ganglion cervicale superius der Ratte wurde als Funktion der mitochondrialen und cytosolischen NADH Redoxpotentiale gemessen, die durch die 'Redoxpuffer' D-ß-Hydroxybutyrat/Acetoacetat bzw. Laktat/Pyruvat in der Perfusionsflüssigkeit eingestellt wurden. Die gleichsinnige Verschiebung beider Redoxpotentiale um 65 mV hatte keinen Einfluß auf die neuronale Funktion.
2) Eine Redoxpotentialdifferenz zwischen mitochondrialem und cytosolischem NADH System (ΔE_{M-C}) von -60 mV wurde als günstigster Wert für ein maximales Aktionspotential ermittelt.
3) Die gegensinnige Veränderung beider Redoxpotentiale führte dagegen zu einer Verminderung des Aktionspotentials auf die Hälfte, wenn das optimale ΔE_{M-C} um 50 mV zum Positiven oder Negativen hin verschoben wurde.
4) Das optimale ΔE_{M-C} betrug auch bei - im Vergleich zu physiologischen Werten - fünffach erhöhter Ausgangskonzentration der vier 'Redoxpuffer'-Substrate -60 mV. Eine Verminderung des Aktionspotentials auf 50% trat bereits bei Schwankungen von ΔE_{M-C} um ±30 mV auf.
5) Jeder der Metabolite Laktat, Pyruvat, D-ß-Hydroxybutyrat und Acetoacetat konnte Glucose als Substrat ersetzen.

Dependence of Neuronal Function on the Redox Potentials of Cellular NADH-Systems.

Summary

1) The compound action potential of the isolated superior cervical ganglion of the Rat was measured as function of the mitochondrial and cytosolic NADH redox potentials, which were poised by the redox buffers D-ß-Hydroxybutyrate/Acetoacetate or Lactate/Pyruvate in the perfusate. A parallel shift of both redox potentials by 65 mV had no effect on the neuronal function.
2) A difference of -60 mV between the redox potentials of the mitochondrial and the cytosolic NADH-system (ΔE_{M-C}) was found to be the optimum for the obtention of a maximal action potential.
3) An antiparallel change of both redox potentials caused a 50% decrease of the action potential, when the optimal ΔE_{M-C} was shifted by 50 mV to positive or negative values.
4) The optimal ΔE_{M-C} was -60 mV, even when the basic concentrations of the 'redox buffers' were 5 times higher than physiological concentration. In this case the action potential could be reduced by 50% by shifting the ΔE_{M-C} by only ±30 mV.
5) Each of the metabolites Lactate, Pyruvate, D-ß-Hydroxybutyrate or Acetoacetate could replace Glucose as substrate.

7. Literaturverzeichnis

1 Bücher, Th. (1970) in Pyridine Nucleotide Dependent Dehydrogenases (Sund, H.,ed.) pp. 439-461, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

2 Bücher, Th. & Sies, H. (1976) in Use of isolated liver cells and kidney tubules in metabolic studies (Tager, J.M., Söling, H.D. & Williamson, J.R., eds.) pp. 41-64, North Holland Publishing Company, Amsterdam.

3 Bücher, Th., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. & Sies, H. (1972) Eur. J. Biochem. 27, 301-317.

4 Williamson, D.H., Lund, P. & Krebs, H.A. (1967) Biochem. J. 103, 514-526.

5 Krebs, H.A. & Veech, R.L. (1969) in The Energy Level and Metabolic Control in Mitochondria (Papa, S., Tager, J.M., Quagliariello, E. & Slater, E.C., eds.) pp. 329-384, Adriatica editrice, Bari.

6 Chamalaun, R.A.F.M. & Tager, J.M. (1970) Biochem. Biophys. Acta 222, 119-134.

7 Scholz, R. & Bücher, Th. (1965) in Control of Energy Metabolism (Chance, B., Estabrook, R.W. & Williamson, J.R., eds.) pp. 393-414, Academic Press, New York, London.

8 Sies, H., Häussinger, D. & Grosskopf, M. (1974) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 305-320.

9 Sies, H., Ta, S.T., Brauser, B. & Bücher, Th. (1972) in Advances in Enzyme Regulations (Weber, G., ed.)

309-322.

9a Sies, H. (1977) in Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Intermediary Metabolism and Neurochemistry, Vol. III (Thurman, R.G., Williamson, J.R., Drott, H.R. & Chance, B., eds.) pp. 47-64, Academic Press, New York, London.

10 Klingenberg, M., v.Haefen, H. & Wenske, G. (1965) Biochem. Zeitschrift 343, 425-478.

11 Avi-Dor, Y., Olson, J.M., Doherty, M.D. & Kaplan, N.O. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2377-2383.

12 Chance, B. & Baltscheffsky, M. (1958) Biochem. J. 68, 283-295.

13 Papa, S., Tager, J.M., Francavilla, A., De Haan, E.J. & Quagliariello, E. (1967) BBA 131, 14-28.

14 Brauser, B., Bücher, Th., Sies, H. & Versmold, H. (1972) in Molecular Basis of Biological Activity, Vol. I (Gaede, K., Horecker, B.C. & Whelan, W.J., eds.) p. 197, Academic Press, New York, London.

15 Dolivo, M., Brauser, B. & Bücher, Th. (1971) Proc. Int. Union Physiol. Sci., IX, p. 147, Abstract 428.

16 Sies, H., Klein, F., Brauser, B. & Bücher, Th. (1971) Proc. Int. Union Physiol. Sci., IX, p. 513, Abstract 1528.

17 Brauser, B., Bücher, Th. & Dolivo, M. (1970) FEBS Letters 8, 297-300.

18 Dolivo, M. (1974) Fed. Proc. 33, 1043-1048.

19 Dolivo, M. (1966) J. Physiol. (Paris) 58, 127-194.

20 Dolivo, M. & Rouiller, Ch. (1969) Progr. Brain Res. 31, 111-123.

21 Dolivo, M. (1962) Bulletin de l'Academic Suisse des Sciences Mèdicales 18, 247-252.

22 Hawkins, R.A. (1971) Biochem. J. 121, p.17 P.

23 Hawkins, R.A., Williamson, D.H. & Krebs, H.A. (1971) Biochem. J. 122, 13-18.

24 Mc Bride, W.V. & Klingman, J.D. (1974) Progress in Neurobiology 3, 251-287.

25 Sokoloff, L. (1972) in Basic Neurochemistry (Albers, R.W., Siegel, G.J., Katzmann, R. & Agranoff, B.W., eds., 1st edn.) pp. 299-326, Little Brown & Co., Boston.

26 Cohen, R.D. & Woods, H.F. (1976) Clinical and Biochemical Aspects of Lactic Acidisis, 1st edn., Blackwell Sci. Publ., London.

27 Oldendorf, W.H. (1971) Europ. Neuro. 6, 49-55.

27a Gjedde, A., Anderson, J. & Eklöf, E. (1975) Acta Phys. Scand. 93, 145-149.

28 Larrabee, M.G., Horowicz, P., Stekiel, W. & Dolivo, M. (1959) in Metabolism of the Nervous System (Richter, D., ed.) pp. 208-220, Pergamon Press, London.

29 Bradford, H.F., Brownlow, E.K. & Gammack, D.B. (1966) J. of Neurochemistry 13, 1283-1297.

30 Nicolescu, P., Dolivo, M., Rouiller, C. & Foroglou-Kerameus, C. (1966) J. Cell Biol. 29, 267-285.

31 Ribaupierre, F., de, Dunant, Y., Dolivo, M. & Foroglou-Kerameus, C. (1968) J. Physiol. (Paris) 60, 531-532.

32 Dolivo, M., Foroglou-Kerameus, C., Kocsis, M., Rouiller, Ch. & Nicolescu, P. (1967) J. Physiol. (Paris) 59, p. 393.

33 Dunant, Y. & Dolivo, M. (1967) J. Physiol. (Paris) 59, 281-294.

34 Dunant, Y. (1967) J. Physiol. (Paris) 59, 17-38.

35 Roch-Ramel, F. (1962) Helv. Physiol. Acta 13, 1-64.

36 Bergmeyer, U.H. (1962) Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr., 253, 266, 36. Methoden der enzymatischen Analyse.

37 Rodkey, F.L. (1955) J. Biol. Chem. 213, 777-786.

38 Wieland, O.H., Siess, E., Schulze-Wethmar, F.H., von Funcke, H.G. & Winton, B. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 143, 593-601.

39 Zebe, E., Delbrück, A. & Bücher, Th. (1957) Ber. ges. Physiol. 189, p. 115.

40 Borst, P. (1963) in Funktionelle Morphologie und Organisation der Zelle (Karlson, P., ed.) pp. 137-158, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

41 La Noue, K.F. & Tischler, M.E. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7522-7528.

42 Mitchell, P. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 996-1005.

43 Klingenberg, M. & Rottenberg, H. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 125-130.

44 Davis, E.J. & Lumeng, L. (1977) in Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Intermediary Metabolism and Neurochemistry, Vol.III (Thurman, R.G., Williamson, J.R., Drott, H.R. & Chance, B., eds.) pp. 243-250, Academic Press, New York, London.

45 Klingenberg, M. (1977) in Alcohol and Aldehyde Metabolizing Systems, Intermediary Metabolism and Neurochemistry, Vol. III (Thurman, R.G., Williamson, J.R., Drott, H.R. & Chance, B., eds.) pp. 25-34, Academic Press, New York, London.

8. Lebenslauf

Name: Diethelm Manfred Kirsch	
geb.: 3.5.1950 in Rotthalmünster (Niederbayern)	
Schulbildung: Volksschule Kößlarn	1956 - 1962
Musisches Gymnasium (Anton Bruckner Gymnasium) Straubing	1962 - 1969
Abitur	15.6.1969
Erstimmatrikulation: Ludwig Maximilians Universität München	WS 1969/70
Vorphysikum	SS 1970
Physikum	WS 1971/72
Studienjahr in England: Victoria Universität Manchester	WS 1972/73 SS 1973
Staatsexamen: Ludwig Maximilians Universität München	WS 1974/75
Doktorarbeit am Institut für physiologische Chemie und physikalische Biochemie	WS 1975/76 SS 1976
Medizinalsaaistentenzeit Klinikum Innenstadt der Universität München, Leitung Prof. Buchborn Städtisches Krankenhaus Pfaffenhofen	1977

Experimentelle Arbeit zur Abhängigkeit der intrazellulären NAD(P)H-Fluoreszenz und Aktionspotential von Pharmaka am oberen Halsganglion der Ratte am Institut für physiologische Chemie und physikalische Biochemie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität, Abteilung Prof. Dr. Weger, Vorstand Prof. Dr. Kiese. 1977/1979

Während Studium und Promotion Stipendiat der Studienstiftung des Deutschen Volkes.